R. ISTITUTO SUPERIORE AGRARIO DI PISA

LABORATORI DI PATOLOGIA VEGETALE

E DI BATTERIOLOGIA AGRARIA

R. OSSERVATORIO REGIONALE DI FITOPATOLOGIA

25.

R. PEROTTI e G. PONTECORVO

ULTERIORI RICERCHE SULLA MICO-BATTERIOSI FIORALE E DEI FRUTTI DELL'OLEANDRO

PISA

STABILIMENTO EDITORIALE VALLERINI

1929 - VII

25.

R. PEROTTI e G. PONTECORVO

ULTERIORI RICERCHE SULLA MICO-BATTERIOSI FIORALE E DEI FRUTTI DELL'OLEANDRO

Fin dal 1926, alcune osservazioni eseguite sulla biologia della *Tubercularia vulgaris,* Tode,[1] indirizzavano il Laboratorio di Patologia di questo Istituto allo studio delle possibili correlazioni funzionali tra due o più organismi agenti di malattie parassitarie.

Invero, in quelle prime ricerche, veniva stabilito come l'azione patogena del fungo *(Tubercularia)* potesse essere favorita dall'intervento di una forma batterica rinvenuta costantemente negli organi colpiti, e che fin d'allora venne isolata e sommariamente descritta.

L'anno scorso cadde l'opportunità di riferire sopra alcune manifestazioni patologiche dei fiori e frutti di Oleandro.[2] L'attenzione degli AA. si fermò sui caratteri esterni della malattia e precisamente sui frutti presentanti notevoli ipertrofie.

Esami morfologici e colturali posero in evidenza, in più tempi, la presenza costante di una forma fungina identificata per *Alternaria tenuis,* Nees. ed una forma batterica.

Come per lo studio della *Tubercularia* fu proceduto anche in questo caso alla ricerca di un'eventuale azione acidificante del substrato da parte del batterio. Ed infatti, nelle moltissime prove eseguite, quando in copia maggiore, quando in copia minore, il batterio isolato si rivelò capace di emissione di sostanze di natura acida che favorivano lo sviluppo del fungo.

---

[1] PEROTTI R. e BONAVENTURA G. - *Ricerche sulla biologia ed in particolare sul parassitismo della « Tubercularia vulgaris »,* Tode. - Boll. Ist. Sup. Agrario di Pisa, 1926.

[2] PEROTTI R. e BONAVENTURA G. - *Mico-batteriosi dei frutti di « Nerium Oleander »,* L. - Boll. Ist. Sup. Agrario di Pisa, 1928.

Ora, sulla scorta di tali risultati, fu ammesso che, nella patogenesi dell'infezione, simili fatti non potessero essere privi di interesse e che appunto il batterio, quasi necessariamente, favorisse in simili manifestazioni patologiche, con i suoi prodotti di elaborazione o di rifiuto, la moltiplicazione dell'agente fungino ed il progresso dell'infezione.

Ad ulteriore conferma ed in proseguimento delle indagini precedenti, anche in questo anno, furono eseguite ricerche delle quali qui appresso è riferito.

Descrizione dei caratteri esterni della malattia ed esame istologico.

Il materiale in esame proveniva da esemplari siti in un giardino di Pisa. Ed il suo aspetto era analogo a quello precedentemente e originariamente esaminato da Perotti e Bonaventura su materiale proveniente da Antignano (Livorno).

Comunque, esso ha riscontro in un grandissimo numero, se non nella generalità degli Oleandri osservati in Provincia di Pisa.

I frutti colpiti si dimostrano ipertrofici, ora in un punto, ora in più, con tendenza della manifestazione a trasferirsi verso l'apice.

Alle ipertrofie corrispondono necrotizzazioni più o meno avanzate interessanti i tessuti superficiali come quelli profondi del frutto.

I fiori risultano precocemente disseccati, atrofici, abortiti.

Nei peduncoli fiorali si constatano parziali abbrunimenti più intensi e più estesi nelle vicinanze degli organi fiorali. Sezionando in corrispondenza di una ipertrofia di frutti è possibile di distinguere, procedendo dall'esterno all'interno, una prima zona di completa necrotizzazione costituita da cel-

lule in piena disorganizzazione, circondate in più punti, da abbondanti filamenti micelici risultanti da ife ora sottili, ora più grosse, comunque sempre settate.

Più oltre, i processi di necrotizzazione si palesano meno avanzati. Nei tessuti, più o meno profondi, si notano, sparse e raggruppate cellule imbrunite e morte. (Vedasi figura nella Tavola).

Sezioni, eseguite lungo i peduncoli fiorali e in corrispondenza degli imbrunimenti, pongono anch'esse in evidenza fenomeni di necrosi.

La necrotizzazione procede dall'alto del penducolo al basso e dall'esterno all'interno ed interessa più tessuti; in primo luogo, quelli esterni, facendo capo all'epidermide ed alla corteccia; quindi, in parte, il libro, non il legno; spesso, nei punti di necrotizzazione più avanzata, il midollo.

Successivamente fu proceduto all'osservazione di alcuni raschiamenti del tessuto necrotizzato. In ognuno di essi si resero distinguibili frammenti di micelio, spore, batteri.

Le spore erano riferibili ad *Alternaria* e *Fusarium*. Quale dei due tipi fosse in predominanza non era possibile accertare; limitatamente alle osservazioni eseguite, si potrebbe credere che lo fosse il *Fusarium*.

Si constatò inoltre e sempre la presenza di piccole forme batteriche, vivacemente mobili.

Isolamento, descrizione e studio dei parassiti.

Per l'isolamento degli agenti patogeni fu proceduto allestendo, con parte dello stemperamento degli organi colpiti in acqua sterile, piastre all'agar-Oleandro. Questo si ottenne agarizzando all'1,5 % il decotto ottenuto facendo bollire per 2 ore e mezzo gr. 100 di foglie e rametti, ben sminuzzati in 500 di acqua.

Dopo alcuni giorni di coltura si svilupparono numerose colonie fungine e batteriche. Le prime erano riferibili ad *Alternaria* e *Fusarium:* furono esse isolate in coltura pura. Delle seconde, inoltre, due che assumevano carattere di predominanza, furono isolate e sottoposte a preliminare riferimento sistematico.

Non si riportano per i funghi che alcune misurazioni eseguite sia sui miceli che sulle spore.

LARGHEZZA DEL MICELIO:

Alternaria	μ. 5 - 7
Fusarium	» 2 - 3,5

DIMENSIONI DELLE SPORE:

	larghezza	lunghezza
Alternaria .	μ. 16 - 17	μ. 48 - 50
Fusarium .	» 6 - 7	» 28 - 38

Per le forme batteriche che distingueremo con le lettere *A* e *B* furono fissati i caratteri che seguono.

Forma *A*.

Su piastre all'agar fagiuoli: colonie superficiali, grandi, isolate dapprima, confluenti in seguito, ialine, lucenti, giallognole, mucose, circolari; poi ellittiche, leggermente rilevate, a contorno continuo, struttura finemente granulosa, nucleate.

Su agar-peptone le colonie: sono superficiali, piccole, isolate, fluorescenti, lucenti, ialine, gialle, mucose, circolari, leggermente rilevate, a contorno continuo, struttura granulosa finissima, nucleate.

Nelle colture a striscio di agar fagiuoli: si forma patina continua, poco estesa, ialina, giallognola, mucosa, a superficie umida, granulosa, lucente, scolante nell'acqua di condensazione che intorbida; assenza di pellicola, forte deposito.

Gli strisci su carota: danno pure patina continua, estesa,

lucente, fortemente gialla, mucosa, con contorno continuo, superficie leggermente granulosa, scolante.

Su patata: patina continua, estesa, lucente, gialla, liscia, secca, non scolante.

In brodo fagiuoli: liquido incoloro, scorrevole, intorbidamento omogeneo; sedimento fioccoso, coperta bianca, grinzosa, poco resistente. Assenza di bollicine gassose.

In brodo di carne: lo sviluppo è meno evidente.

Nelle infissioni in gelatina: si ottiene sviluppo per tutta l'infissione e in superficie, nastriforme, non ramificato, biancastro. Assenza di fluidificazione.

Si tratta di corti bastoncini ad estremità arrotondante misuranti μ 2,7-3 per 0,8-1.

Prendono bene i colori di anilina, ma non resistono alla decolorazione secondo Gram.

Mobili, asporulanti.

Forma *B*.

Le colonie su piastre all'agar-fagiuoli: si presentano superficiali, di grandezza varia, isolate, opache, lucenti, leggermente fluorescenti, bianche, membranacee. Hanno una forma un poco varia, contorno continuo, più o meno lobato, struttura omogenea, e sono nucleate.

Su agar-peptone: il polimorfosmo è ancora più accentuato, il contorno delle colonie è prevalentemente frangiato.

Nelle colture a striscio su agar fagiuoli: si forma patina continua, estesa, bianco-opaca, membranacea, a superficie liscia, contorno lobato, non scolante nell'acqua di condensazione.

Su carota: patina continua, membranacea, secca, bianca, a superficie grinzosa e margine continuo.

In brodo fagiuoli: liquido incoloro, scorrevole, limpido, con sedimento fioccoso e coperta bianca, grossa, resistente, liscia. Assenza di bollicine gassose.

In brodo peptone: caratteri analoghi a quelli ottenuti in brodo fagiuoli.

Nelle infissioni in gelatina: si ha sviluppo in superficie e per breve tratto dell'infissione. Affossamento superficiale; assenza di fluidificazione.

Si tratta di bastoncini di μ 3-3,5×1-1,5, spesso abbinati colorantisi con i comuni colori di anilina, ma non resistenti al Gram.

Mobilissimi, asporulanti.

***

Queste forme furono isolate da materiale in via di necrotizzazione appartenente a frutti diversi.

Contemporaneamente si provvide all' isolamento di forme rinvenentesi nella tipica Rogna dell'Oleandro, come descritta, dal Tonelli; e ciò per potere eventualmente stabilire confronti fra il *Bact. Tonellianum* e le forme ora isolate dai frutti.

Furono allestite piastre all'agar-fagiuoli, ed in esse non si ebbe a notare che lo sviluppo di colonie batteriche tra le quali una nettamente predominante riferibile al *Bact. Tonellianum.*

Indagini Patogeniche.

Il *Bact. Tonellianum* non offre caratteri tali che possano avvicinarlo alle forme *A* e *B* da noi isolate dai tessuti necrotizzati dei fiori e dei frutti di Oleandro.

Era a ritenersi perciò che queste debbano relazionarsi alla necrosi messa in evidenza, nella quale debbono pur rientrare quali agenti le forme fungine isolate.

Per cui, al fine di poter stabilire gli eventuali rapporti di sinergesi tra tutte queste specie, si provvide anzitutto a determinare il comportamento di esse sui substrati all'azzurro bromo-timolo in rapporto alla reazione del mezzo.

Si accertò che su agar-fagiuoli:

Alternaria - non acidifica.
Fusarium - » »
Forma batterica A - fortemente acidifica.
» » *B* - » »

In seguito, sullo stesso substrato rivelatore si portarono ansate di funghi e batteri, secondo lo schema di cui appresso:

Piastra n. 1 - *Bact.* (forma A) + *Fusarium*
» » 2 » (» ») + *Alternaria.*
» » 3 » (» B) + *Fusarium.*
» » 4 » (» ») + *Alternaria.*

Coltivato in termostato a 22° C, al termine del quindicesimo giorno si notò in tutte le piastre sviluppo notevole di batteri e funghi con acidificazione del mezzo da parte soltanto delle forme batteriche, poichè in corrispondenza dello sviluppo fungino il substrato rimaneva inalterato. Non fu osservato in queste colture alcun fenomeno chemiotattico tra le due forme, contrariamente a quanto si constatò nelle precedenti ricerche di uno di noi con Bonaventura eseguite con batterio ed *Alternaria.*

Ciò però non sembra che debba poter escludere qualche rapporto sinergetico tra le due forme, in quanto le prove di inoculazione qui appresso riferite forniscono alcuni dati favorevoli in proposito.

Verso l'inizio dell'estate, (1° giugno 1928) si ritenne opportuno di eseguire alcune inoculazioni di dette forme su giovani rami sani di Oleandro, presso il R. Orto Botanico di Pisa.

S' inocularono separatamente le tre forme batteriche (forma *A, B* e la Tonelliana) nonchè le due forme fungine;

quindi, rispettivamente ciascuna forma batterica con ciascuna forma fungina.

Nel prosieguo dell'esperienza si umettarono sera e mattina le parti inoculate per mantenere in ambiente sufficientemente umido i tessuti delle due piante di Oleandro su cui si sperimentava.

All'inizio dell'autunno — premesso che l'estate si svolse con eccezionale siccità ed elevata temperatura e che gli esemplari appartenevano a varietà a fiore bianco da noi riscontrate più raramente affette da mico-batteriosi — si constatò quanto segue:

1°	Inoculaz.	eseguita	con	Bact.	*A*	-	nessun attacco.
2°	»	»	»	»	*B*	-	id. id.
3°	»	»	»	»	*Tonellianum*	-	leggera necrotizzazione non estesa.
4°	»	»	»		*Alternaria*	-	nessun attacco.
5°	»	»	»		*Fusarium*	-	forte ed estesa necrotizzazione.
6°	»	»	»	»	*A* e *Fusarium*	-	id.
7°	»	»	»	»	*B* »	-	id.
8°	»	»	»	»	*Tonell.* e *Fusarium*	-	id.
9°	»	»	»	»	*A* e *Alternaria*	-	nessun attacco
10°	»	»	»	»	*B* »	-	id.
11°	»	»	»	»	*Tonell.* »	-	id.

A queste osservazioni fecero seguito esami microscopici sui tessuti necrotizzati. La necrotizzazione, nei quattro casi 5, 6, 7, 8, si estendeva profondamente fino a raggiungere il midollo. Tra i tessuti necrotizzati era evidentissimo ed abbondatissimo micelio intercellulare sottile e numerose forme batteriche.

Controlli colturali confermarono la presenza della forma batterica inoculata.

CONCLUSIONI.

È a concludersi pertanto, che in alcuni casi la malattia in esame dell'Oleandro è determinata prevalentemente da Fusarium; *in altri casi, come era risultato dal precedente studio di Perotti e Bonaventura, essa può esserlo da* Alternaria *in concorrenza dell'azione di batteri acidificanti.*

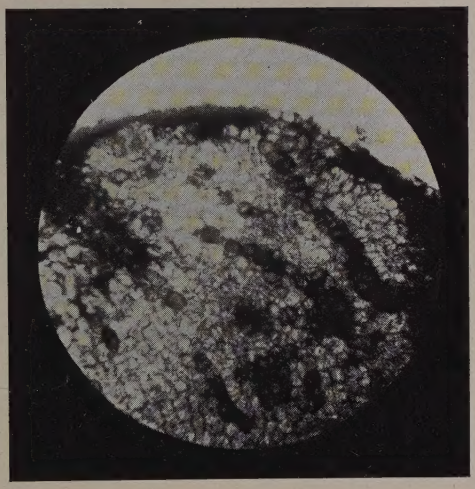
Ed è anche a presumersi che, se l'attacco delle forme batteriche associate all' Alternaria *non ha avuto esito, ciò potrebbe dipendere dal fatto che le inoculazioni, per l'avanzata stagione nel corrente anno, sono state eseguite sui rami anzichè sulle infiorescenze; che le dette specie batteriche non siano appartenenti alla medesima specie di quella precedentemente studiata ed abbiano trovato condizioni estrinseche non favorevoli all'attacco (siccità ed elevata temperatura).*

Le ricerche perciò saranno proseguite, anche per meglio definire sistematicamente le varie forme microrganiche agenti.

Nella mico-batteriosi in esame, comunque, una più intensa e profonda azione patogenica sembra doversi ascrivere al Fusarium *che non all'* Alternaria.

Dal Laboratorio di Patologia Vegetale del R. Istituto Superiore Agrario, dicembre 1928 - Anno VII.

TAVOLA.



Sezione di peduncolo fiorale
di *Nerium Oleander*, L.